EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red)

Code K5361

2nd edition/ 2ème édition/ 2. Ausgabe

For use with rabbit and mouse primary antibodies. For 150 tests.

Utilisation avec des anticorps primaires de souris et de lapin. Pour 150 tests.

Zur Verwendung mit primären Kaninchen- und Mausantikörpern für 150 Tests.

Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use 5
Summary and Explanation 5
Principles of Procedure 5
Reagents 5
Reagents provided 5
Materials required, but not provided 6
Precautions 7
Storage 7
Specimen Preparation 7
Procedure 8
A. Reagent preparation 8
A.1 DAB+ Working Solution 8
A.2 Permanent Red Working Solution 8
A.3 Guideline for optimal dilution of primary antibodies 8
B. Staining procedure for manual use 8
B.1 Procedural notes 8
B.2 Staining protocol 8
C. Staining procedure for Dako Autostainer instruments 10
Interpretation of Results 11
Reference 27
Explanation of symbols 28

FRANÇAIS

Intérêt 12
Résumé et explication 12
Principes de la procédure 12
Réactifs 12
Réactifs fournis 12
Matériels requis, mais non fournis 13
Précautions 14
Conservation 15
Préparation de l'échantillon 15
Procédure 15
A. Préparation des réactifs 15
A.1 Solution de DAB+ dosée 15
A.2 Solution Permanent Red dosée 15
A.3 Directive relative à la dilution optimale des anticorps primaires 15
B. Procédure de coloration pour une utilisation manuelle 16
B.1 Remarques relatives à la procédure 16
B.2 Protocole de coloration 16
C. Procédure de coloration pour les instruments Dako Autostainer 18
Interprétation des résultats 19
Référence 27
Explication des symboles 28

DEUTSCH

Verwendungszweck 20
Zusammenfassung und Erklärung 20
Verfahrensprinzip 20
Reagenzien 20
Mitgelieferte Reagenzien 20
Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material 21
Vorsichtsmaßnahmen 22
Aufbewahrung 23
Vorbereitung der Probe 23
Verfahren 23
A. Reagenzvorbereitung 23
A.1 DAB+-Arbeitslösung 23
A.2 Permanent Red-Arbeitslösung 23
A.3 Richtlinie für die optimale Verdünnung primärer Antikörper 23
B. Manuelles Färbeverfahren 24
B.1 Hinweise zum Verfahren 24
B.2 Färbeprotokoll 24
C. Färbeverfahren für Dako Autostainer-Geräte 25
Auswertung der Ergebnisse 27
Literatur 27
Erläuterung der Symbole 28

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

EnVision™ G|2 Doublestain System is intended for use in immunohistochemistry with Dako primary mouse and rabbit antibodies for the detection of antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues or fixed cell smears. This visualization system is designed for the simultaneous detection of two different antigens within one specimen. The system may be used in manual procedures or with Dako Autostainer instruments.

Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and Explanation

EnVision™ G|2 Doublestain System is a 2nd generation EnVision™ visualization kit. This system is useful for the simultaneous detection of two antigens present in low concentrations within one specimen. The visualization is based on peroxidase (HRP) using DAB+ as chromogen and alkaline phosphatase (AP) using Permanent Red as chromogen. The system is biotin-free, thus significantly reducing non-specific staining resulting from endogenous avidin-biotin activity.

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Principles of Procedure

The procedure is a sequential double staining where the first antigen is visualized using HRP/DAB+ and the second antigen is visualized using AP/Permanent Red. Dual Endogenous Enzyme Block inhibits endogenous alkaline phosphatase, peroxidase, and pseudoperoxidase activity present in some tissues. After blocking of endogenous enzymes, the first step is incubation of the specimen with an optimally diluted primary mouse or rabbit antibody, followed by incubation with the Polymer/HRP reagent. This reagent is an HRP-conjugated dextran polymer that also carries antibodies to mouse and rabbit immunoglobulins. The reaction is visualized by DAB+ Chromogen. Following a blocking step using the Doublestain Block reagent, the specimen is incubated with a second optimally diluted primary mouse or rabbit antibody. In the next step Rabbit/Mouse (LINK) is added; a dextran polymer carrying antibodies to mouse and rabbit immunoglobulins, followed by incubation with the Polymer/AP reagent. Permanent Red Chromogen visualizes the second reaction. All specified reagents, except the primary antibodies, are provided with the kit.

Reagents

Reagents provided

The materials listed below are sufficient for 150 tests. The number of tests is based on the use of 200 µL of each reagent per test:

Vial 1	3 x 11 mL	DUAL ENDOGENOUS ENZYME BLOCK **Dual Endogenous Enzyme Block** Ready-to-use. Endogenous enzyme block solution, containing 0.5% hydrogen peroxide, detergents, enzyme inhibitors, and preservative, pH 2.
Vial 2	3 x 11 mL	POLYMER/HRP **Polymer/HRP** Ready-to-use.

Dextran polymer conjugated with horseradish peroxidase and affinity-isolated immunoglobulins. Supplied in Tris/HCl buffer containing stabilizing protein and preservative.

Vial 3	3 x 11 mL	DAB+ SUBSTRATE BUFFER **DAB+ Substrate Buffer** Substrate buffer solution, pH 7.5, containing <0.1% hydrogen peroxide, stabilizers, enhancers, and an antimicrobial agent.
Vial 4	1 x 1.5 mL	DAB+ CHROMOGEN **DAB+ Chromogen** 5% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen solution.
Vial 5	3 x 11 mL	DOUBLESTAIN BLOCK **Doublestain Block** Ready-to-use. Blocking solution.
Vial 6	3 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Ready-to-use. Dextran polymer coupled with secondary antibodies against mouse and rabbit immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.
Vial 7	3 x 11 mL	POLYMER/AP **Polymer/AP** Ready-to-use. Dextran polymer conjugated with alkaline phospatase and affinity-isolated immunoglobulins. Supplied in Tris/HCl buffer containing stabilizing protein and a preservative.
Vial 8	3 x 11 mL	PERMANENT RED SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Substrate buffer solution.
Vial 9	1 x 300 µL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Permanent Red Chromogen solution.

Materials required, but not provided

Absorbent wipes
Ammonia water, 37 mmol/L (optional)
Antibody Diluent, Dako code S0809 or S2022
Counterstain; Hematoxylin, such as water-based Dako Mayer's Hematoxylin code S3309
Coverslips
Dako Autostainer instrument (optional)
Dako primary antibodies and negative control reagents
Distilled or deionised water
Epitope Retrieval Solution
Ethanol, 95% and 70%
Humid chamber (optional)
Light microscope (20-800x objective magnification)
Mounting media, such as Dako Glycergel™ Mounting Medium, code C0563, or Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use, code S3025, or non-aqueous permanent mounting medium, Dako code S3026
Positive and negative tissues to use as process controls
Slides, SuperFrost Plus, poly-L-lysine coated slides or Dako Silanized Slides, code S3003

Staining jars or baths
Timer (capable of 2-40 minute intervals)
Wash bottles
Wash Buffer, Dako code S3006
Water bath with lid
Xylene, toluene or xylene substitutes

Precautions

1. For professional users.
2. Vial 2, Polymer/HRP, Vial 6, Rabbit/Mouse (LINK), and Vial 7, Polymer/AP, contain material of animal origin. As with any product derived from biological sources, proper handling should be used.
3. Do not expose Vial 3, DAB+ Chromogen or Vial 9, Permanent Red Chromogen or the prepared DAB+ Working Solution or Permanent Red Working Solution to strong light.
4. Vial 4, DAB+ Chromogen, contains 1-5% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (biphenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraammonium tetrachloride) and is labelled:
   Harmful.
   R40 Limited evidence of a carcinogenic effect.
   R43 May cause sensitisation by skin contact.
   R68 Possible risk of irreversible effects.
   S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
   S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

   Vial 9, Permanent Red Chromogen, contains Fast Red KL salt and is labelled:
   Toxic.
   R45 May cause cancer.
   S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
   S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).
   S53 Avoid exposure - obtain special instructions before use.

   Caution. This product contains a substance, which has not yet been fully tested.
   The classification has been made solely on the basis of a comparison with substances with a similar structure.

   As a main rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper working procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.
5. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
6. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
7. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store the kit at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on the kit. Do not interchange kit components from different lots. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services.

Specimen Preparation

The kit can be used for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and fixed cell smears. A variety of fixatives may be used for specimen preservation. Standard methods for tissue processing

for immunohistochemical staining should be used for all tissue sections (1). The optimal thickness of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and frozen sections is 4-6 µm. The specimen should be mounted on microscope slides. The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

NOTE: For use on Dako Autostainer instruments, the microscope slides must have a width of no more than 26 mm to be able to fit into the slide holder.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionised water. The water bath should contain no additives (such as gelatine, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried by heating, generally at a temperature < 60 °C for a minimum of 60 minutes (e.g. overnight). To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven-drying process.

Procedure

A. Reagent preparation

A.1 DAB+ Working Solution

DAB+ Working Solution is prepared by thoroughly mixing 1 mL of DAB+ Substrate Buffer (Vial 3) with 1 drop (25-30 µL) of DAB+ Chromogen (Vial 4). Each 1 mL aliquot is sufficient for 10 tissue sections. Prepare only the volume required for the number of slides that shall be stained. Prepared DAB+ Working Solution is stable for approximately 5 days when stored at 2-8 °C. This solution should be mixed thoroughly prior to use. Any precipitate developing within 5 days in the solution does not affect staining quality. DAB+ Working Solution should be prepared in an Autostainer Reagent Vial when used on the Dako Autostainer instrument.

A.2 Permanent Red Working Solution

Permanent Red Working Solution is prepared by thoroughly mixing 100 parts of Permanent Red Substrate Buffer (Vial 8) with 1 part of Permanent Red Chromogen (Vial 9), e.g. mix 1 mL Permanent Red Substrate Buffer (Vial 8) with 10 µL Permanent Red Chromogen (Vial 9). Prepare only the volume required for the number of slides that shall be stained. Use the solution within 30 minutes. Permanent Red Working Solution should be prepared in an Autostainer Reagent Vial when used on the Dako Autostainer instrument.

A.3 Guideline for optimal dilution of primary antibodies

EnVision™ G|2 Doublestain System is compatible with suitably diluted Dako concentrated primary antibodies. Optimal dilution should be determined by the user.

B. Staining procedure for manual use

B.1 Procedural notes

The following pre-treatment steps should be carried out before using EnVision™ G|2 Doublestain System on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The specimen should be deparaffinized and rehydrated. Some specimens should be subjected to epitope demasking by heat-induced epitope retrieval or enzyme digestion. Please refer to the package insert of the individual primary antibody for specific information on specimen preparation. Following demasking, the specimen should be rinsed gently with wash buffer solution from a wash bottle (do not focus directly on tissue) and placed in a fresh wash buffer bath for 5 minutes.

All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25 °C) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow specimens to dry out during the staining procedure. Dried specimens may display increased non-specific staining.

B.2 Staining protocol

Step 1: Vial 1, Dual Endogenous Enzyme Block

Tap off excess wash buffer and carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep the reagent within the prescribed area. Apply 200 µL Dual Endogenous Enzyme Block to cover specimen. Incubate for 5 (± 1) minutes. Rinse gently with wash buffer

solution from a wash bottle (do not focus directly on tissue) and place in a fresh wash buffer bath for 5 minutes.

Step 2: Primary antibody No. 1 or negative control reagent No. 1
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL mouse or rabbit primary antibody or negative control reagent (see section A.3) to cover specimen. Incubate for 10 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1.

Step 3: Vial 2, Polymer/HRP
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Polymer/HRP to cover specimen. Incubate for 10 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1, twice.

Step 4: DAB+ Working Solution
Prepare DAB+ Working Solution as described in section A.1.

Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL DAB+ Working Solution to cover specimen. Incubate for 5-15 minutes. Optimal incubation time may vary and should be determined by each individual laboratory. Rinse specimen gently with distilled or deionised water from a wash bottle (do not focus directly on tissue). Collect DAB+ Working Solution waste in a hazardous materials container for proper disposal. If the staining procedure must be interrupted, slides may be kept in a wash buffer bath following incubation of DAB+ Working Solution for up to one hour at room temperature (20-25 °C) without affecting staining result.

Step 5: Vial 5, Doublestain Block
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Doublestain Block to cover specimen. Incubate for 3 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1.

Step 6: Primary antibody No. 2 or negative control reagent No. 2
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL optimally diluted mouse or rabbit primary antibody or negative control reagent (see section A.3) to cover specimen. Incubate for 10 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1.

Step 7: Vial 6, Rabbit/Mouse (LINK)
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Rabbit/Mouse (LINK) to cover the specimen. Incubate for 10 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1, twice.

Step 8: Vial 7, Polymer/AP
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Polymer/AP to cover the specimen. Incubate for 10 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1, twice.

Step 9: Permanent Red Working Solution
Prepare Permanent Red Working Solution as described in section A.2. Prepared Permanent Red Working Solution should be used within 30 minutes.

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Permanent Red Working Solution to cover the specimen. Incubate for 5-20 minutes. Optimal incubation time may vary and should be determined by each individual laboratory. Rinse slides gently with distilled or deionised water from a wash bottle (do not focus directly on specimen). Collect chromogen-containing waste in a hazardous materials container for proper disposal. Place rinsed slides in a fresh distilled or deionised water bath for 5 minutes.

Step 10: Counterstain (instructions are for hematoxylin)
Immerse slides in a bath of hematoxylin. Length of incubation time depends on the strength of hematoxylin used. Follow hematoxylin counterstaining with a thorough rinse in distilled or deionised water.

Optional: Immerse tissue slides into a bath of 37 mmol/L ammonia water and rinse gently in distilled or deionised water for 2-5 minutes. Ammonia water (37 mmol/L) is prepared by mixing 2.5 mL of 15 mol/L (concentrated) ammonia hydroxide with 1 liter of distilled or deionised water. Unused 37 mmol/L ammonia water may be stored at room temperature (20-25 °C) in a tightly capped bottle for up to 12 months.

Step 11: Mounting
For aqueous mounting, mounting media such as Dako Glycergel™ Mounting Medium, code C0563 or Faramount Aqueous Mounting Medium code S3025 is recommended.

For non-aqueous, permanent mounting, Dako Permanent Mounting Media, code S3026 is recommended after slides have been left to air-dry completely.

C. Staining procedure for Dako Autostainer instruments

All reagents in the kit, except Vial 4 and Vial 9, are provided in Autostainer Reagent Vials. DAB+ Working Solution and Permanent Red Working Solution should both be prepared in Autostainer Reagent Vials, when used on the Dako Autostainer Instrument. EnVision™ G|2 Doublestain System has been adapted for use on the Dako Autostainer instruments according to the template outlined below.

Before staining according to the template on the Dako Autostainer Instruments, carefully read the **Operators Manual for the dedicated Autostainer Instrument.**

Prior to starting the Autostainer Instrument, slides and reagents must be placed according to the **Slide Layout Map** and the **Reagent Layout Map.**

The following pre-treatment steps should be carried out before using EnVision™ G|2 Doublestain System on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The specimen should be deparaffinized and rehydrated. Some specimens should be subjected to epitope demasking by heat-induced epitope retrieval or enzyme digestion. Please refer to section A.3 and the package insert of the individual Dako primary antibody for specific information on specimen preparation. Following demasking, the specimen should be rinsed gently with wash buffer solution from a wash bottle (do not focus directly on tissue) and placed in a fresh wash buffer bath for 5 minutes.

All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25 °C) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow specimens to dry out during the staining procedure. Dried specimens may display increased non-specific staining.

Step 1: Programming of the Autostainer Instrument

Prior to the first application of EnVision™ G|2 Doublestain System on Dako Autostainer Instrument, a new template has to be made. Please refer to the template below and to Operators Manual for the dedicated Autostainer Instrument.

Template: K5361

1. Rinse Buffer
2. End.Enz. Block
3. Rinse Buffer
4. Primary Antibody
5. Rinse Buffer
6. Secondary Reagent
7. Rinse Buffer
8. Rinse Buffer
9. *Swtch
10. Substrate
11. Rinse Water
12. *Swtch
13. Auxiliary
14. Rinse Buffer
15. Primary Antibody
16. Rinse Buffer
17. Secondary Reagent
18. Rinse Buffer
19. Rinse Buffer
20. Tertiary Reagent
21. Rinse Buffer
22. Rinse Buffer
23. *Swtch
24. Substrate-Batch
25. Rinse Water
26. *Swtch

NOTE: Before loading slides according to the **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**, the following reagents have to be added to the reagent list. Please refer to Table 1 below for name,

template step and incubation time, and to Operator's Manual for the dedicated Autostainer Instrument.

Table 1. Necessary additions to the reagent list

Reagent	Code	Template Step	Incubation Time
Dual Endogenous Enzyme Block	K5361	End. Enz. Block	5 minutes
Primary antibodies not already in the Autostainer list	Individual	Primary Antibody	10 minutes
Polymer/HRP	K5361	Secondary Reagent	10 minutes
DAB+ Working Solution	K5361	Substrate	10 minutes
Doublestain Block	K5361	Auxiliary	3 minutes
Primary antibodies not already in the Autostainer list	Individual	Primary Antibody	10 minutes
Rabbit/Mouse (LINK)	K5361	Secondary Reagent	10 minutes
Polymer/AP	K5361	Tertiary Reagent	10 minutes
Permanent Red Working Solution	K5361	Substrate-Batch	10 minutes

Step 2: Staining protocol

Load the Template (**K5361**) for EnVision™ G|2 Doublestain System kit, into the **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**. Specify the number of slides in the run, and load the reagents with incubation times into the template. The positioning of the slides will then be shown in the **Slide Layout Map Screen**, and the positioning and volume of the reagent to be loaded on the Autostainer Instrument will be shown in the **Reagent Layout Map Screen**. Please also refer to the Operator's Manual.

Prior to loading the slides according to the **Slides Layout Map Screen**, it is recommended to pre-wet the slides for 5 minutes in Dako Wash Buffer, code S3006. Position the vials in the reagent rack according to the **Reagent Layout Map**. Take care to load proper reagents and proper volumes. Pay particular attention to the loading of the vials with primary antibodies. Prime the water and buffer pumps. Start the program. After program end rinse slides in distilled or deionised water. For counterstain and mounting, please refer to Step 10 and 11 in section B.2.

Interpretation of Results

The antigen recognized by primary antibody No. 1 is stained with DAB+ chromogen. Use of DAB+ chromogen yields a brown-coloured end product. The antigen recognized by primary antibody No. 2 is stained with Permanent Red chromogen. Use of Permanent Red chromogen yields a red-coloured end product. Both colours allow for visualization against a hematoxylin counterstain.

If non-specific staining is present, this will be recognized as a diffuse, brown or red staining on the slides treated with the negative control reagent.

Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

FRANÇAIS

Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

Le système EnVision™ G|2 Doublestain est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les anticorps primaires de souris et de lapin Dako dans le cadre de la détection des antigènes dans les tissus fixés au formol, inclus en paraffine ou les frottis cellulaires fixés. Ce système de révélation a été conçu pour la détection simultanée de deux antigènes différents sur un échantillon unique. Le système peut être utilisé dans le cadre de procédures manuelles ou avec les instruments Dako Autostainer.

L'interprétation des résultats doit être réalisée par un professionnel certifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et des autres examens diagnostiques.

Résumé et explication

Le système EnVision™ G|2 Doublestain est un kit de révélation EnVision™ de 2^{e} génération. Ce système est utile pour la détection simultanée de deux antigènes présents à de faibles concentrations dans un seul échantillon. La révélation est basée sur la peroxydase (HRP) à l'aide de DAB+ comme chromogène et de phosphatase alcaline (AP) à l'aide de Permanent Red comme chromogène. Le système n'emploie pas de biotine, ce qui permet de réduire de façon significative la coloration non spécifique provenant de l'activité avidine-biotine endogène.

Voir les *Instructions générales de coloration immunohistochimique* Dako ou les instructions du système de détection concernant les procédures IHC pour : 1) Principe de la procédure, 2) Matériels requis, mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation de l'échantillon, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle de qualité, 7) Résolution des problèmes, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Principes de la procédure

La procédure est constituée d'une double coloration séquentielle dans laquelle le premier antigène est révélé à l'aide de HRP/DAB+ et le second antigène est révélé à l'aide de AP/Permanent Red. Le réactif de blocage des deux enzymes endogènes inhibe l'activité de la phosphatase alcaline, de la peroxydase et de la pseudoperoxydase endogènes présentes dans certains tissus. Après blocage des enzymes endogènes, la première étape est une incubation de l'échantillon avec un anticorps de souris ou de lapin convenablement dilué, suivie d'une incubation avec le réactif Polymère/HRP. Ce réactif est un polymère de dextran conjugué avec la HRP qui transporte également les anticorps dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. La réaction est révélée par le chromogène DAB+. Après l'étape de blocage utilisant le réactif de blocage Doublestain, l'échantillon est incubé avec un second anticorps de souris ou de lapin convenablement dilué. Au cours de l'étape suivante, le réactif Lapin/Souris (LINK) est ajouté ; il s'agit d'un polymère de dextran transportant les anticorps dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin, puis il est suivi d'une incubation avec le réactif Polymère/AP. Le chromogène Permanent Red permet de révéler la seconde réaction. Tous les réactifs spécifiés, à l'exception des anticorps primaires, sont fournis dans le kit.

Réactifs

Réactifs fournis

Les matériels qui figurent dans la liste ci-dessous permettent de réaliser 150 tests. Le nombre de tests est basé sur l'utilisation de 200 µl de réactif par test.

Flacon 1	3 x 11 ml	DUAL ENDOGENOUS ENZYME BLOCK Blocage des deux enzymes endogènes Prêt à l'emploi. Solution de blocage des enzymes endogènes, contenant 0,5 % de peroxyde d'hydrogène, des détergents, des inhibiteurs enzymatiques, et un conservateur, pH 2.
Flacon 2	3 x 11 ml	POLYMER/HRP Polymère/HRP Prêt à l'emploi. Polymère de dextran conjugué à de la peroxydase de raifort et immunoglobulines isolées par affinité. Fourni dans un tampon Tris-HCl contenant une protéine de stabilisation et un conservateur.
Flacon 3	3 x 11 ml	DAB+ SUBSTRATE BUFFER Tampon substrat DAB+ Solution de tampon substrat, pH 7,5, contenant du peroxyde d'hydrogène à <0,1 %, des stabilisants, des activateurs et un agent antimicrobien.
Flacon 4	1 x 1,5 ml	DAB+ CHROMOGEN Chromogène DAB+ Solution chromogène de tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine à 5 %.
Flacon 5	3 x 11 ml	DOUBLESTAIN BLOCK Blocage Doublestain Prêt à l'emploi. Solution de blocage.
Flacon 6	3 x 11 ml	RABBIT/MOUSE (LINK) Lapin/Souris (LINK) Prêt à l'emploi. Polymère de dextran couplé aux anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. En solution tamponnée contenant une protéine de stabilisation et un conservateur.
Flacon 7	3 x 11 ml	POLYMER/AP Polymère/AP Prêt à l'emploi. Polymère de dextran conjugué à la phosphatase alcaline et à des immunoglobulines isolées par affinité. Fourni dans un tampon Tris/HCl contenant une protéine de stabilisation et un conservateur.
Flacon 8	3 x 11 ml	PERMANENT RED SUBSTRATE BUFFER Tampon substrat Permanent Red Solution de substrat tamponnée.
Flacon 9	1 x 300 µl	PERMANENT RED CHROMOGEN Chromogène Permanent Red Solution de chromogène Permanent Red.

Matériels requis, mais non fournis
Tissus absorbants
Ammoniaque, 37 mmol/l (en option)
Diluant anticorps, Dako code S0809 ou S2022
Contre-colorant ; hématoxyline, de type hématoxyline de Mayer aqueuse Dako, code S3309
Lamelles couvre-objet

Instrument Dako Autostainer (en option)
Anticorps primaires et réactif de contrôle négatif Dako
Eau distillée ou désionisée
Solution de démasquage de l'épitope
Éthanol, 95 % et 70 %
Chambre humide (en option)
Microscope optique (grossissement 20-800x)
Milieu de montage de type Dako Glycergel™ Mounting Medium, code C0563 ou milieu de montage aqueux Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use, code S3025 ou milieu de montage permanent non aqueux Dako code S3026.
Tissus positifs et négatifs à utiliser comme procédé de contrôle
Lames, SuperFrost Plus, lames revêtues de poly-L-lysine ou Dako Silanized Slides, code S3003
Cuves ou bains de coloration
Minuterie (capable de mesurer des intervalles de 2 à 40 minutes)
Pissettes
Tampon de lavage, code Dako S3006
Bain-marie avec couvercle
Xylène, toluène ou substituts de xylène

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Le flacon 2 : Polymère/HRP, le flacon 6 : Lapin/Souris (LINK) et le flacon 7 : Polymère/AP contiennent des matières d'origine animale. Comme pour tout produit provenant d'une source biologique, une manipulation appropriée s'impose.
3. Ne pas exposer le flacon 3 : Chromogène DAB+ ou le flacon 9 : Chromogène Permanent Red ou les solutions de DAB+ ou de Permanent Red dosées, une fois préparées, à une forte lumière.
4. Le flacon 4 : Chromogène DAB+ contient 1-5 % de tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine (tétrachlorure de biphényl-3,3',4,4'-tétrayltétraammonium) et est étiqueté :
   Nocif.
   R40 Effet cancérogène suspecté - preuves insuffisantes.
   R43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
   R68 Risque possible d'effets irréversibles.
   S35 Ce produit et son récipient doivent être éliminés comme des déchets dangereux.
   S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

   Le flacon 9 : Chromogène Permanent Red contient des sels Fast Red KL et est étiqueté :
   Toxique.
   R45 Peut provoquer un cancer.
   S35 Ce produit et son récipient doivent être éliminés comme des déchets dangereux.
   S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).
   S53 Éviter l'exposition - se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation.

   Avertissement. Ce produit contient une substance qui n'a pas encore été totalement testée. Sa classification s'est effectuée uniquement d'après des comparaisons avec des substances présentant une structure similaire.

   En règle générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être soigneusement informés des procédures de travail appropriées, du caractère dangereux de ce produit et des instructions de sécurité nécessaires. Veuillez vous reporter à la fiche de données de sécurité (FDS) pour plus d'informations.
5. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des canalisations pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métalliques. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans la tuyauterie.
6. Porter un équipement de protection personnel approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.

7. Se débarrasser de la solution inutilisée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

Conservation

Conserver le kit à l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le kit. Ne pas intervertir les composants de la trousse provenant de lots différents. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles spécifiées, ces conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. En cas de réactions imprévues ne pouvant pas être expliquées par des changements de procédures de laboratoire et de suspicion d'un problème avec le produit, contactez nos Services techniques.

Préparation de l'échantillon

Le kit peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol et les frottis cellulaires fixés. Plusieurs types de fixateurs peuvent être utilisés pour conserver les échantillons. Les méthodes standard de traitement des tissus en vue d'une coloration immunohistochimique doivent être utilisées pour toutes les coupes de tissus (1). L'épaisseur optimale des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol et des coupes congelées est de 4-6 µm. Les échantillons doivent être montés sur des lames pour microscope. Les coupes doivent être montées sur les lames de façon aussi plate et lisse que possible. La présence de plissements trop nombreux affecterait les résultats de la coloration.

REMARQUE : Pour pouvoir entrer dans le porte-lames et être utilisées avec le Dako Autostainer, les lames de microscope ne doivent pas dépasser 26 mm de largeur.

Les coupes en paraffine doivent être montées depuis un bain-marie préchauffé contenant de l'eau distillée ou désionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (comme de la gélatine, de la poly-L-lysine, etc.). Les coupes seront séchées par chauffage, généralement à une température ne dépassant pas 60 °C, pendant 60 minutes au moins (toute la nuit par exemple). Afin que les coupes adhèrent parfaitement aux lames, il est important d'évacuer toute l'eau se trouvant sous les coupes avant le processus de séchage à l'étuve.

Procédure

A. Préparation des réactifs

A.1 Solution de DAB+ dosée

La solution DAB+ dosée est préparée en mélangeant soigneusement 1 ml de tampon substrat DAB+ (flacon 3) avec 1 goutte (25-30 µl) de chromogène DAB+ (flacon 4). Chaque aliquote de 1 ml est suffisante pour 10 coupes de tissu. Préparer uniquement le volume nécessaire pour traiter le nombre de lames à colorer. Une fois préparée, la solution DAB+ dosée est stable pendant environ 5 jours si elle est conservée à 2-8 °C. Cette solution doit être soigneusement mélangée avant emploi. La formation d'un précipité dans la solution dans les 5 jours n'affecte pas la qualité de la coloration. La solution DAB+ dosée doit être préparée dans un flacon de réactif Autostainer quand elle est utilisée sur un instrument Dako Autostainer.

A.2 Solution Permanent Red dosée

La solution Permanent Red dosée est préparée en mélangeant soigneusement 100 parties de tampon substrat Permanent Red (flacon 8) avec 1 partie de chromogène Permanent Red (flacon 9) ; par exemple, mélanger 1 ml de tampon substrat Permanent Red (flacon 8) avec 10 µl de chromogène Permanent Red (flacon 9). Préparer uniquement le volume nécessaire pour traiter le nombre de lames à colorer. Utiliser la solution dans les 30 minutes. La solution Permanent Red dosée doit être préparée dans un flacon de réactif Autostainer quand elle est utilisée sur un instrument Dako Autostainer.

A.3 Directive relative à la dilution optimale des anticorps primaires

Le système EnVision™ G|2 Doublestain est compatible avec les anticorps primaires concentrés Dako convenablement dilués. La dilution optimale doit être déterminée par l'utilisateur.

B. Procédure de coloration pour une utilisation manuelle

B.1 Remarques relatives à la procédure

Les étapes de prétraitement suivantes doivent être mises en œuvre avant d'utiliser le système EnVision™ G|2 Doublestain sur les coupes de tissus, fixées au formol et incluses en paraffine. L'échantillon doit être déparaffiné et réhydraté. Certains échantillons doivent faire l'objet d'un démasquage de l'épitope par restauration de l'épitope par la chaleur ou digestion enzymatique. Pour plus d'informations sur la préparation de l'échantillon, veuillez vous référer à la notice de l'anticorps primaire individuel. Après le démasquage, l'échantillon doit être délicatement rincé à l'aide d'une solution tampon de lavage provenant d'un flacon pissette (ne pas diriger le jet directement vers les tissus) et placé dans un bain de solution tampon de lavage fraîche pendant 5 minutes.

Tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (20-25 °C) avant la coloration immunologique. De même, toutes les incubations doivent se dérouler à température ambiante.

Ne pas laisser sécher les échantillons pendant la procédure de coloration. Les échantillons desséchés peuvent présenter une coloration non spécifique accrue.

B.2 Protocole de coloration

Étape 1 : Flacon 1, Blocage des deux enzymes endogènes
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer soigneusement le contour de l'échantillon pour éliminer tout le liquide restant et maintenir le réactif à l'intérieur de la zone spécifiée. Appliquer 200 µl de la solution de blocage des deux enzymes endogènes pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 5 (± 1) minutes. Rincer doucement les lames à l'aide d'une solution tampon de lavage provenant d'une pissette (ne pas diriger le jet directement vers les tissus) et les placer dans un bain de solution tampon de lavage fraîche pendant 5 minutes.

Étape 2 : Anticorps primaire n° 1 ou réactif de contrôle négatif n° 1
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution d'anticorps primaire de lapin ou de souris ou de réactif de contrôle négatif (voir section A.3) pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 10 (± 1) minutes. Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1.

Étape 3 : Flacon 2, Polymère/HRP
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution Polymère/HRP pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 10 (± 1) minutes. Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1, deux fois.

Étape 4 : Solution de DAB+ dosée
Préparer la solution de DAB+ dosée comme indiqué à la section A.1.

Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution de DAB+ dosée pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber pendant 5 à 15 minutes. La durée optimale de l'incubation peut varier et doit être déterminée par chaque laboratoire. Rincer soigneusement avec de l'eau distillée ou désionisée provenant d'une pissette (ne pas diriger le jet directement vers les tissus). Recueillir la solution de DAB+ dosée rejetée dans un récipient pour matières dangereuses afin de l'éliminer de façon appropriée. Si la procédure de coloration doit être interrompue, les lames peuvent être conservées dans un bain de tampon de lavage après l'incubation dans la solution de DAB+ dosée, et ce jusqu'à une heure à température ambiante (20-25 °C) sans que cela affecte les résultats de la coloration.

Étape 5 : Flacon 5, Blocage Doublestain
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution de blocage Doublestain pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 3 (± 1) minutes. Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1.

Étape 6 : Anticorps primaire n° 2 ou réactif de contrôle négatif n° 2
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution d'anticorps primaire de lapin ou de souris ou bien de réactif de contrôle négatif (voir section A.3) pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 10 (± 1) minutes. Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1.

Étape 7 : Flacon 6, Lapin/Souris (LINK)
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution Lapin/Souris (LINK) pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 10 (± 1) minutes. Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1, deux fois.

Étape 8 : Flacon 7, Polymère/AP
Éliminer le tampon de lavage en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution Polymère/AP pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber 10 (± 1) minutes. Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1, deux fois.

Étape 9 : Solution Permanent Red dosée
Préparer la solution Permanent Red dosée comme indiqué à la section A.2. La solution Permanent Red dosée doit être utilisée dans les 30 minutes.

Éliminer le tampon en excès en tapotant et essuyer les lames comme précédemment. Appliquer 200 µl de la solution Permanent Red dosée pour recouvrir l'échantillon. Laisser incuber pendant 5 à 20 minutes. La durée optimale de l'incubation peut varier et doit être déterminée par chaque laboratoire. Rincer les lames soigneusement avec de l'eau distillée ou désionisée provenant d'une pissette (ne pas diriger le jet directement vers les tissus). Recueillir les déchets contenant le chromogène inutilisé dans le récipient pour produits dangereux afin de les éliminer de façon appropriée. Placer les lames rincées dans un bain d'eau distillée ou désionisée fraîche pendant 5 minutes.

Étape 10 : Contre-coloration (instructions pour l'hématoxyline)
Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline. La durée de l'incubation dépend de la concentration de l'hématoxyline utilisée. Faire suivre la contre-coloration à l'hématoxyline d'un rinçage soigneux à l'eau distillée ou désionisée.

Facultatif : immerger les lames de tissus dans un bain d'ammoniaque à 37 mmol/l et rincer délicatement à l'eau distillée ou désionisée pendant 2-5 minutes. L'ammoniaque (37 mmol/l) est préparée en mélangeant 2,5 ml d'hydroxyde d'ammonium à 15 mol/l (concentré) avec 1 litre d'eau distillée ou désionisée. L'ammoniaque à 37 mmol/l inutilisée peut être conservée à température ambiante (20-25 °C) dans un flacon fermé hermétiquement pendant une période de 12 mois.

Étape 11 : Montage
Pour un montage aqueux, les milieux de montage tels que le Dako Glycergel™ Mounting Medium, code C0563 ou le Faramount Aqueous Mounting Medium code S3025 sont recommandés.

Pour un montage non aqueux, le milieu de montage permanent, Dako Permanent Mounting Media, code S3026 est recommandé après que les lames ont pu complètement sécher à l'air libre.

C. Procédure de coloration pour les instruments Dako Autostainer

Tous les réactifs du kit, à l'exception des flacons 4 et 9, sont fournis dans des flacons de réactifs Autostainer. La solution DAB+ dosée et la solution Permanent Red dosée doivent toutes deux être préparées dans des flacons de réactifs Autostainer, quand elles sont utilisées avec le Dako Autostainer Instrument. Le système EnVision™ G|2 Doublestain a été adapté pour pouvoir être utilisé avec les instruments Dako Autostainer conformément au modèle indiqué ci-dessous.

Avant de procéder à la coloration selon les instructions du modèle sur les appareils Dako Autostainer, lire soigneusement **le Manuel de l'opérateur de l'instrument Autostainer correspondant.**

Avant de démarrer l'instrument Autostainer, les lames et les réactifs doivent être positionnés selon **le Plan de disposition des lames** et **le Plan de disposition des réactifs.**

Les étapes de prétraitement suivantes doivent être mises en œuvre avant d'utiliser le système EnVision™ G|2 Doublestain sur les coupes de tissus, fixées au formol et incluses en paraffine. L'échantillon doit être déparaffiné et réhydraté. Certains échantillons doivent faire l'objet d'un démasquage de l'épitope par restauration de l'épitope par la chaleur ou digestion enzymatique. Pour des informations spécifiques sur la préparation de l'échantillon, veuillez vous référer à la section A.3 et à la notice de l'anticorps primaire individuel Dako. Après le démasquage, l'échantillon doit être délicatement rincé à l'aide d'une solution tampon de lavage provenant d'une pissette (ne pas diriger le jet directement vers les tissus) et placé dans un bain de solution tampon de lavage fraîche pendant 5 minutes.

Tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (20-25 °C) avant la coloration immunologique. De même, toutes les incubations doivent se dérouler à température ambiante.

Ne pas laisser sécher les échantillons pendant la procédure de coloration. Les échantillons desséchés peuvent présenter une coloration non spécifique accrue.

Étape 1 : Programmation de l'instrument Autostainer

Avant la première utilisation du système EnVision™ G|2 Doublestain avec l'instrument Dako Autostainer, il est nécessaire de réaliser un nouveau modèle. Veuillez consulter le modèle ci-dessous ainsi que le Manuel de l'opérateur de l'instrument Autostainer correspondant.

Modèle : K5361

1. Rinse Buffer
2. End.Enz. Block
3. Rinse Buffer
4. Primary Antibody
5. Rinse Buffer
6. Secondary Reagent
7. Rinse Buffer
8. Rinse Buffer
9. *Swtch
10. Substrate
11. Rinse Water
12. *Swtch
13. Auxiliary
14. Rinse Buffer
15. Primary Antibody
16. Rinse Buffer
17. Secondary Reagent
18. Rinse Buffer
19. Rinse Buffer
20. Tertiary Reagent
21. Rinse Buffer
22. Rinse Buffer
23. *Swtch
24. Substrate-Batch
25. Rinse Water
26. *Swtch

REMARQUE : Avant de charger les lames selon les instructions de **l'ÉCRAN EXÉCUTION DU PROGRAMME DE COLORATION**, les réactifs suivants doivent être ajoutés à la liste des réactifs. Veuillez consulter le Tableau 1 ci-dessous et le Manuel de l'opérateur de l'instrument

Autostainer correspondant pour connaître les noms, les étapes du modèle et les durées d'incubation.

Tableau 1 : Ajouts nécessaires à la liste des réactifs

Réactif	**Code**	**Étape du modèle**	**Durée d'incubation**
Blocage des deux enzymes endogènes	K5361	Bloc. Enz. End.	5 minutes
Anticorps primaires ne figurant pas déjà dans la liste Autostainer	Individuel	Anticorps primaire	10 minutes
Polymère/HRP	K5361	Réactif secondaire	10 minutes
Solution de DAB+ dosée	K5361	Substrat	10 minutes
Blocage Doublestain	K5361	Auxiliaire	3 minutes
Anticorps primaires ne figurant pas déjà dans la liste Autostainer	Individuel	Anticorps primaire	10 minutes
Lapin/Souris (LINK)	K5361	Réactif secondaire	10 minutes
Polymère/AP	K5361	Réactif tertiaire	10 minutes
Solution Permanent Red dosée	K5361	Substrat-Lot	10 minutes

Étape 2 : Protocole de coloration

Charger le modèle (**K5361**) pour le kit du système EnVision™ G|2 Doublestain, sur l'**ÉCRAN EXÉCUTION DU PROGRAMME DE COLORATION.** Indiquer le nombre de lames de la série, et charger les réactifs et leurs durées d'incubation dans le modèle. Le positionnement des lames sera alors indiqué sur l'**écran Plan de disposition des lames**, et le positionnement et le volume de réactif devant être chargés sur l'instrument Autostainer seront indiqués sur l'**écran Plan de disposition des réactifs.** Veuillez également consulter le manuel de l'opérateur.

Avant de charger les lames selon les instructions du **Plan de disposition des lames**, il est conseillé d'humidifier les lames pendant 5 minutes dans du tampon de lavage Dako, code S3006. Placer les flacons dans le portoir à réactifs selon le **Plan de disposition des réactifs**. Veiller à charger les réactifs appropriés et à utiliser les volumes corrects. Apporter une attention toute particulière au chargement des flacons d'anticorps primaires. Amorcer les pompes à eau et à tampon. Démarrer le programme. À la fin du programme, rincer les lames avec de l'eau distillée ou désionisée. Pour la contre-coloration et le montage, veuillez consulter les étapes 10 et 11 de la section B.2.

Interprétation des résultats

L'antigène reconnu par l'anticorps primaire n° 1 est coloré par le chromogène DAB+. L'emploi du chromogène DAB+ conduit à un produit final coloré en brun. L'antigène reconnu par l'anticorps primaire n° 2 est coloré par le chromogène Permanent Red. L'emploi du chromogène Permanent Red conduit à un produit final coloré en rouge. Ces deux couleurs permettent une révélation par rapport à la contre-coloration due à l'hématoxyline.

Une coloration non spécifique apparaîtra comme une coloration brune ou rouge diffuse sur les lames traitées avec le réactif de contrôle négatif.

Les noyaux seront colorés en bleu par la contre-coloration par l'hématoxyline**.**

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Das EnVision™ G|2 Doublestain System dient zum immunhistochemischen Nachweis von Antigenen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben oder fixierten Zellausstrichen unter Verwendung primärer Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper von Dako. Dieses Visualisierungssystem dient zum gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Antigenen innerhalb einer Probe. Das System kann in manuellen Verfahren oder mit Dako Autostainer-Geräten verwendet werden.

Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Beim EnVision™ G|2 Doublestain System handelt es sich um ein EnVision™ Visualisierungssystem der zweiten Generation. Dieses System eignet sich für den gleichzeitigen Nachweis von zwei Antigenen, die in niedrigen Konzentrationen in einer Probe vorhanden sind. Die Visualisierung basiert auf Peroxidase (HRP) mit DAB+ als Chromogen und alkalischer Phosphatase (AP) mit Permanent Red als Chromogen. Da es sich um ein biotinfreies System handelt, werden unspezifische Färbungen aus endogenen Avidin-Biotin-Aktivitäten deutlich abgeschwächt.

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen:
1) Verfahrensprinzipien, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Verfahrensprinzip

Das Verfahren ist eine sequenzielle Doppelfärbung, bei der das erste Antigen mit HRP/DAB+ und das zweite Antigen mit AP/Permanent Red sichtbar gemacht wird. Der duale endogene Enzym-Block hemmt die in einigen Geweben vorhandene endogene alkalische Phosphatase-, Peroxidase- und Pseudoperoxidase-Aktivität. Nach der Blockierung endogener Enzyme ist der erste Schritt die Inkubation der Probe mit einem optimal verdünnten primären Maus- oder Kaninchen-Antikörper, gefolgt von der Inkubation mit dem Polymer-/HRP-Reagenz. Dieses Reagenz ist ein HRP-konjugiertes Dextranpolymer, das auch Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobuline enthält. Die Reaktion wird durch DAB+ Chromogen visualisiert. Nach einem Blockierungsschritt mit dem Doublestain Block-Reagenz wird die Probe mit einem zweiten, optimal verdünnten primären Maus- oder Kaninchen-Antikörper inkubiert. Im nächsten Schritt wird Rabbit/Mouse (LINK) hinzugegeben, ein Dextranpolymer, das Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-Immunglobuline trägt, gefolgt von der Inkubation mit dem Polymer-/AP-Reagenz. Permanent Red Chromogen visualisiert die zweite Reaktion. Alle angegebenen Reagenzien, außer den primären Antikörpern, sind im Kit enthalten.

Reagenzien

Mitgelieferte Reagenzien

Die unten aufgeführten Materialien sind ausreichend für 150 Tests. Die Anzahl der Tests basiert auf einer Reagenzienmenge von je 200 µL pro Test.

Fläschchen 1	3 x 11 mL	DUAL ENDOGENOUS ENZYME BLOCK	**Dual Endogenous Enzyme Block** Gebrauchsfertig. Endogene Enzym-Blockierungslösung, enthält 0,5 % Wasserstoff-peroxid, Tenside, Enzymhemmer und Konservierungsmittel, pH 2.

Fläschchen 2	3 x 11 mL	POLYMER/HRP	**Polymer/HRP** Gebrauchsfertig. Mit Meerrettichperoxidase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertes Dextranpolymer. Geliefert in Tris/HCI-Puffer mit Stabilisatorprotein und Konservierungsmittel.
Fläschchen 3	3 x 11 mL	DAB+ SUBSTRATE BUFFER	**DAB+ Substrate Buffer** Substratpufferlösung, pH 7,5, enthält <0,1 % Wasserstoffperoxid, Stabilisatoren, Beschleuniger und eine antimikrobielle Substanz.
Fläschchen 4	1 x 1,5 mL	DAB+ CHROMOGEN	**DAB+ Chromogen** 5 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Chromogenlösung.
Fläschchen 5	3 x 11 mL	DOUBLESTAIN BLOCK	**Doublestain Block** Gebrauchsfertig. Blockierungslösung.
Fläschchen 6	3 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK)	**Rabbit/Mouse (LINK)** Gebrauchsfertig. Mit sekundären Antikörpern gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobuline gekoppeltes Dextranpolymer. In gepufferter Lösung, enthält ein stabilisierendes Protein und Konservierungsmittel.
Fläschchen 7	3 x 11 mL	POLYMER/AP	**Polymer/AP** Gebrauchsfertig. Mit alkalischer Phosphatase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertes Dextranpolymer. Geliefert in Tris/HCI-Puffer mit Stabilisatorprotein und Konservierungsmittel.
Fläschchen 8	3 x 11 mL	PERMANENT RED SUBSTRATE BUFFER	**Permanent Red Substrate Buffer** Substratpuffer-Lösung.
Fläschchen 9	1 x 300 µL	PERMANENT RED CHROMOGEN	**Permanent Red Chromogen** Permanent Red Chromogen-Lösung.

Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material
Absorbierende Tücher
Ammoniakwasser, 37 mmol/L (optional)
Antibody Diluent, Dako Code-Nr. S0809 oder S2022
Gegenfärbung; Hämatoxylin, z.B. Dako Mayer's Hematoxylin, Code-Nr. S3309 (auf wässriger Basis)
Deckgläser
Dako Autostainer-Gerät (optional)
Dako Primäre Antikörper und Negativkontrollen
Destilliertes oder entionisiertes Wasser
Epitope Retrieval Solution
Ethanol, 95 % und 70 %
Feuchtigkeitskammer (optional)

Lichtmikroskop (20-fache bis 800-fache Vergrößerung)
Fixiermittel, wie Dako Glycergel™ Mounting Medium (Code-Nr. C0563) oder Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use (Code-Nr. S3025) bzw. Non-Aqueous Permanent Mounting Medium, Dako Code-Nr. S3026
Positive und negative Kontrollgewebe zur Verfahrenskontrolle
Objektträger, SuperFrost Plus, Poly-L-Lysin-beschichtet oder Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003
Färbeschalen oder Bäder
Zeitmesser (muss Intervalle von 2–40 Minuten anzeigen können)
Waschflaschen
Wash Buffer, Dako Code-Nr. S3006
Wasserbad mit Deckel
Xylol, Toluol oder Xylolersatz

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Fläschchen 2, Polymer/HRP, Fläschchen 6, Kaninchen/Maus (LINK) und Fläschchen 7, Polymer/AP enthalten Material tierischen Ursprungs. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
3. Fläschchen 3, DAB+ Chromogen oder Fläschchen 9, Permanent Red Chromogen oder die angesetzte DAB+-Arbeitslösung oder Permanent Red-Arbeitslösung keinem starken Lichteinfall aussetzen.
4. Fläschchen 4, DAB+ Chromogen, enthält 1–5 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Biphenyl-3,3',4,4'-Tetrayltetraammonium-Tetrachlorid) und ist gekennzeichnet: Gesundheitsschädlich.
   R40 Krebserregende Wirkung nicht auszuschließen.
   R43 Sensibilisierung durch Kontakt mit der Haut möglich.
   R68 Irreversible Schäden möglich.
   S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
   S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

   Fläschchen 9, Permanent Red Chromogen enthält Fast Red KL-Salz und ist gekennzeichnet: Giftig.
   R45 Kann Krebs erzeugen.
   S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
   S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
   S53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

   Vorsicht! Dieses Produkt enthält eine Substanz, die noch nicht vollständig erforscht wurde. Die Klassifizierung ist ausschließlich auf der Grundlage eines Vergleichs mit Substanzen ähnlicher Struktur erfolgt.

   Personen unter 18 Jahren dürfen mit diesem Produkt grundsätzlich nicht arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Weitere Informationen bitte dem Material-Sicherheitsdatenblatt (MSDS) entnehmen.
5. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
6. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
7. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Das Kit bei 2–8 °C aufbewahren. Das Kit nach Ablauf des auf dem Kit aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Kitkomponenten aus unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Vorbereitung der Probe

Das Kit kann für formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte und fixierte Zellausstriche verwendet werden. Für die Konservierung der Proben sind verschiedene Fixiermittel geeignet. Für alle Gewebeschnitte Standardmethoden der Gewebeverarbeitung zur immunhistochemischen Färbung verwenden (1). Die optimale Dicke von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten und Gefrierschnitten beträgt 4–6 µm. Die Probe wird auf einem Mikroskop-Objektträger fixiert. Die Schnitte sind auf den Objektträgern so flach und faltenfrei wie möglich zu fixieren. Zu viele Falten wirken sich negativ auf die Färbungsergebnisse aus.

HINWEIS: Für den Einsatz in Dako Autostainern dürfen die Objektträger nicht breiter als 26 mm sein, damit sie in die Objektträger-Halterung passen.

Paraffineingebettete Schnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad (destilliertes oder entionisiertes Wasser) heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Additive enthalten (wie z.B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden mindestens 60 Minuten lang (z.B. über Nacht) durch Wärme getrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 °C. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

Verfahren

A. Reagenzvorbereitung

A.1 DAB+-Arbeitslösung

DAB+-Arbeitslösung wird durch gründliches Vermischen von 1 mL DAB+ Substratpuffer (Fläschchen 3) mit 1 Tropfen (25–30 µL) DAB+ Chromogen (Fläschchen 4) zubereitet. Jeweils 1 mL Aliquot ist ausreichend für 10 Gewebeschnitte. Nur soviel ansetzen, wie für die zu färbenden Objektträger erforderlich ist. Zubereitete DAB+-Arbeitslösung ist bei Lagerung bei 2–8 °C etwa 5 Tage stabil. Diese Lösung vor Gebrauch gründlich durchmischen. Die Qualität der Färbung wird durch ein innerhalb von 5 Tagen in der Lösung auftretendes Präzipitat nicht beeinträchtigt. Ist die DAB+-Arbeitslösung für den Dako Autostainer vorgesehen, diese in einem Reagenzglas des Autostainers ansetzen.

A.2 Permanent Red-Arbeitslösung

Eine Permanent Red Chromogen-Arbeitslösung wird durch gründliches Mischen von 100 Teilen Permanent Red Substratpuffer (Fläschchen 8) mit einem (1) Teil Permanent Red Chromogen (Fläschchen 9) angesetzt, z.B. durch Mischen von 1 mL Permanent Red Substratpuffer aus Fläschchen 8 mit 10 µL Permanent Red Chromogen (Fläschchen 9). Nur soviel ansetzen, wie für die Anzahl der zu färbenden Objektträger erforderlich ist. Lösung innerhalb von 30 Minuten verbrauchen. Ist die Permanent Red-Arbeitslösung für den Dako Autostainer vorgesehen, diese in einem Reagenzglas des Autostainers ansetzen.

A.3 Richtlinie für die optimale Verdünnung primärer Antikörper

Das EnVision™ G|2 Doublestain System ist kompatibel mit Dako konzentrierten primären Antikörpern in geeigneter Verdünnung. Optimale Verdünnungen sind vom Anwender selbst zu ermitteln.

B. Manuelles Färbeverfahren

B.1 Hinweise zum Verfahren

Folgende Vorbehandlungsschritte vor Anwendung des EnVision™ G|2 Doublestain Systems auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten durchführen. Die Probe entparaffinieren und rehydrieren. Einige Proben bedürfen einer Epitopdemaskierung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung oder enzymatische Andauung. Detaillierte Angaben zur Probenvorbereitung bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers entnehmen. Nach der Demaskierung die Probe mit Waschpufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und 5 Minuten in ein frisches Waschpufferbad legen.

Vor Beginn der Immunfärbung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20–25 °C) bringen. Alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.

Proben dürfen während der Färbung nicht austrocknen. Trockene Proben können unspezifische Färbungen aufweisen.

B.2 Färbeprotokoll

Schritt 1: Fläschchen 1, Dual Endogenous Enzyme Block
Überschüssigen Waschpuffer durch Abklopfen entfernen und den Bereich um die Probe herum vorsichtig abtupfen, um Flüssigkeitsreste zu entfernen und das Reagenz an der vorgesehenen Stelle zu halten. 200 µL Dual Endogenous Enzyme Block auftragen, um Probe zu bedecken. 5 (± 1) Minuten inkubieren. Mit Pufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und 5 Minuten in ein frisches Pufferbad legen.

Schritt 2: Primärer Antikörper Nr. 1 oder Negativ-Kontrollreagenz Nr. 1
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. 200 µL primären Maus- oder Kaninchen-Antikörper oder Negativkontrolle zugeben (siehe Abschnitt A.3), um die Probe zu bedecken. 10 (± 1) Minuten inkubieren. Probe wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 3: Fläschchen 2, Polymer/HRP
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. 200 µL Polymer/HRP aufbringen, um Probe zu bedecken. 10 (± 1) Minuten inkubieren. Probe zweimal wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 4: DAB+-Arbeitslösung
Die DAB+-Arbeitslösung wie in Abschnitt A.1 beschrieben ansetzen.

Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. Die Probe mit 200 µL DAB+-Arbeitslösung bedecken. 5–15 Minuten inkubieren. Die optimale Inkubationszeit kann unterschiedlich sein und sollte vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Probe mit destilliertem oder entionisiertem Wasser aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen. Abfallprodukte der DAB+-Arbeitslösung in einem Sondermüllbehälter auffangen und entsprechend entsorgen. Wenn das Färbeverfahren unterbrochen werden muss, können die Objektträger in einem Waschpufferbad nach der Inkubation von DAB+-Arbeitslösung bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufbewahrt werden, ohne dass das Färberesultat beeinträchtigt wird.

Schritt 5: Fläschchen 5, Doublestain Block
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. 200 µL Doublestain Block zugeben, um die Probe zu bedecken. 3 (± 1) Minuten inkubieren. Probe wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 6: Primärer Antikörper Nr. 2 oder Negativ-Kontrollreagenz Nr. 2
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. 200 µL optimal verdünnten primären Maus- oder Kaninchen-Antikörper oder Negativkontrolle zugeben (siehe Abschnitt A.3), um die Probe zu bedecken. 10 (± 1) Minuten inkubieren. Probe wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 7: Fläschchen 6, Kaninchen/Maus (LINK)
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. 200 µL Kaninchen/Maus (LINK) zugeben, um die Probe zu bedecken. 10 (± 1) Minuten inkubieren. Probe zweimal wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 8: Fläschchen 7, Polymer/AP
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. Die Probe mit 200 µL Polymer/AP bedecken. 10 (±1) Minuten inkubieren. Probe zweimal wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 9: Permanent Red Arbeitslösung
Permanent Red Arbeitslösung wie in Abschnitt A.2 beschrieben zubereiten. Zubereitete Permanent Red Arbeitslösung innerhalb von 30 Minuten verwenden.

Überschüssigen Puffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. Die Probe mit 200 µL Permanent Red Arbeitslösung bedecken. 5–20 Minuten inkubieren. Die optimale Inkubationszeit kann unterschiedlich sein und sollte vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Objektträger mit destilliertem oder entionisiertem Wasser aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen. Chromogenhaltige Abfallprodukte in einem Sondermüllbehälter auffangen und entsprechend entsorgen. Objektträger 5 Minuten in einem frischen Bad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen.

Schritt 10: Gegenfärbung (Anweisungen für Hämatoxylin)
Objektträger in ein Hämatoxylin-Bad eintauchen. Die Inkubationsdauer richtet sich nach der Stärke der verwendeten Hämatoxylinlösung. Nach der Hämatoxylin-Gegenfärbung gründlich in destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen.

Optional: Die Objektträger mit den Gewebeschnitten in ein Bad mit 37 mmol/L Ammoniakwasser einlegen und 2–5 Minuten vorsichtig mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen. Ammoniakwasser (37 mmol/L) wird durch Mischen von 2,5 (± 0,5) mL (konzentriertem) 15 mol/L Ammoniumhydroxid mit 1 Liter destilliertem oder entionisiertem Wasser zubereitet. Nicht verwendetes 37 mmol/L Ammoniakwasser kann bei Raumtemperatur (20–25 °C) in einer gut verschlossenen Flasche bis zu 12 Monate aufbewahrt werden.

Schritt 11: Fixierung
Zur Fixierung im wässrigen Medium werden Fixiermittel wie Dako Glycergel™ Mounting Medium, Code-Nr. C0563 oder Faramount Aqueous Mounting Medium, Code-Nr. S3025 empfohlen.

Zur permanenten Fixierung im nicht-wässrigen Medium wird Dako Permanent Mounting Media, Code-Nr. S3026 empfohlen, nachdem die Objektträger an der Luft vollständig getrocknet sind.

C. Färbeverfahren für Dako Autostainer-Geräte

Alle Reagenzien des Kits, mit Ausnahme von Fläschchen 4 und 9, werden in Autostainer Reagenzfläschchen geliefert. DAB+- und Permanent Red Arbeitslösung in Autostainer Reagenzfläschchen zubereiten, wenn sie auf einem Dako Autostainer-Gerät verwendet werden. EnVision™ G|2 Doublestain System wurde, wie aus der untenstehenden Matrix ersichtlich, für die Verwendung auf den Dako Autostainer-Geräten optimiert.

Das Bedienerhandbuch des betreffenden Autostainer-Geräts vor Färbungen mit Dako Autostainern gemäß dem Schema gründlich lesen.

Objektträger und Reagenzien müssen vor der Verwendung des Autostainers gemäß dem **Objektträger-Positionierungsschema** und dem **Reagenz-Positionierungsschema** eingesetzt werden.

Folgende Vorbehandlungsschritte vor Anwendung des EnVision™ G|2 Doublestain System auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte durchführen. Die Probe entparaffinieren und rehydrieren. Einige Proben bedürfen einer Epitopdemaskierung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung oder enzymatische Andauung. Detaillierte Angaben zur Probenvorbereitung bitte Abschnitt A.3 und der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen. Nach der Demaskierung die Probe mit Waschpufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und 5 Minuten in ein frisches Waschpufferbad legen.

Vor Beginn der Immunfärbung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20–25 °C) bringen. Alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.

Proben dürfen während der Färbung nicht austrocknen. Trockene Proben können unspezifische Färbungen aufweisen.

Schritt 1: Programmierung des Autostainers

Vor der erstmaligen Verwendung des EnVision™ G|2 Doublestain Systems auf dem Autostainer-Gerät ist eine neue Matrix/ein neues Schema zu erstellen. Bitte für den jeweiligen Autostainer die Matrix unten und das Benutzerhandbuch beachten.

Matrix: K5361

1. Rinse Buffer
2. End.Enz. Block
3. Rinse Buffer
4. Primary Antibody
5. Rinse Buffer
6. Secondary Reagent
7. Rinse Buffer
8. Rinse Buffer
9. *Swtch
10. Substrate
11. Rinse Water
12. *Swtch
13. Auxiliary
14. Rinse Buffer
15. Primary Antibody
16. Rinse Buffer
17. Secondary Reagent
18. Rinse Buffer
19. Rinse Buffer
20. Tertiary Reagent
21. Rinse Buffer
22. Rinse Buffer
23. *Swtch
24. Substrate-Batch
25. Rinse Water
26. *Swtch

HINWEIS: Vor dem Beladen mit Objektträgern gemäß dem **BILDSCHIRM FÄRBEDURCHLAUF PROGRAMMIEREN** müssen folgende Reagenzien zur Reagenzienliste hinzugefügt werden. Bitte Bezeichnung, Matrixschritt und Inkubationszeit der Tabelle 1 und dem Benutzerhandbuch des jeweiligen Autostainers entnehmen.

Tabelle 1. Notwendige Ergänzungen der Reagenzienliste

Reagenz	**Code-Nr.**	**Matrix-Schritt**	**Inkubations-zeit**
Dual Endogenous Enzyme Block	K5361	End. Enz. Block	5 Minuten
In der Autostainer-Liste noch nicht enthaltene primäre Antikörper	Individuell	Primärer Antikörper	10 Minuten
Polymer/HRP	K5361	Sekundäres Reagenz	10 Minuten
DAB+-Arbeitslösung	K5361	Substrat	10 Minuten
Doublestain Block	K5361	Zusätzlich	3 Minuten
In der Autostainer-Liste noch nicht enthaltene primäre Antikörper	Individuell	Primärer Antikörper	10 Minuten
Rabbit/Mouse (LINK)	K5361	Sekundäres Reagenz	10 Minuten
Polymer/AP	K5361	Tertiäres Reagenz	10 Minuten
Permanent Red Arbeitslösung	K5361	Substrat-Charge	10 Minuten

Schritt 2: Färbeprotokoll

Die Matrix (**K5361**) für das EnVision™ G|2 Doublestain System-Kit in den **BILDSCHIRM FÄRBEDURCHLAUF PROGRAMMIEREN** laden. Die Anzahl der Objektträger im Durchlauf angeben und die Reagenzien und deren Inkubationszeiten in die Matrix eingeben. Die Positionen der Objektträger werden dann im **Objektträger-Positionierungsschema-Bildschirm** angezeigt, während der **Reagenz-Positionierungsschema-Bildschirm** die Positionen und Volumina der in den Autostainer zu ladenden Reagenzien angibt. Bitte auch das Benutzerhandbuch zu Rate ziehen.

Es ist empfehlenswert, die Objektträger vor der Beladung gemäß dem **Objektträger-Positionierungsschema-Bildschirm** 5 Minuten in Dako Wash Buffer, Code-Nr. S3006, vorzubefeuchten. Die Fläschchen entsprechend dem **Reagenz-Positionierungsschema** in den Reagenzständer einsetzen. Unbedingt die richtigen Reagenzien in den korrekten Mengen verwenden. Dabei insbesondere bei der Beladung der Fläschchen mit primären Antikörpern äußerst sorgfältig vorgehen. Die Wasser- und Pufferpumpen vorfüllen. Das Programm starten. Nach Beendigung des Programms die Objektträger mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen. Angaben zu Gegenfärbung und Fixierung bitte den Schritten 10 und 11 in Abschnitt B.2 entnehmen.

Auswertung der Ergebnisse

Das vom primären Antikörper Nr. 1 erkannte Antigen wird mit DAB+ Chromogen angefärbt. Die Verwendung von DAB+ Chromogen ergibt ein braun gefärbtes Endprodukt. Das vom primären Antikörper Nr. 2 erkannte Antigen wird mit Permanent Red Chromogen angefärbt. Die Verwendung von Permanent Red Chromogen ergibt ein rot gefärbtes Endprodukt. Beide Farben ermöglichen eine Visualisierung gegen eine Hämatoxylin-Gegenfärbung.

Das Vorliegen einer unspezifischen Färbung stellt sich als diffuse, braune oder rote Färbung der mit der Negativkontrolle behandelten Objektträger dar.

Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

Reference/ Référence/ Literatur

1. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: CV Mosby Company; 1980

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	2 °C 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Use by Utiliser avant Verwendbar bis	Toxic Toxique Giftig
IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Σ Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller	
Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Xn Harmful Nocif Gesundheitsschädlich	

Produced by/ Produit par/ Hersteller:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Denmark/ Danemark/ Dänemark
Tel.+45 44 85 95 00
Fax+45 44 85 95 95